

7/3/98

BI

Empfangsbescheinigung

DEUTSCHES PATENTAMT

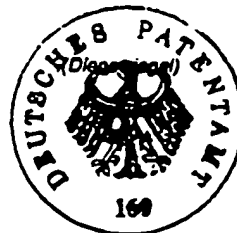
|   |  |                   |  |                         |
|---|--|-------------------|--|-------------------------|
| ① | Sendungen des Deutschen Patentamts sind zu richten an:   |                   | <b>Antrag<br/>auf Erteilung eines Patents</b>  |                         |
|   | Herrn Patentanwalt<br>Dr. Hans D. Boeters<br>Bereiteranger 15<br>81541 München   |                   |  |                         |
|   |  |                   | Aktenzeichen (wird vom Deutschen Patentamt vergeben)<br>137 07 505.3   |                         |
| ② | Zeichen des Anmelders/Vertreters (max. 20 Stellen)<br>8513-GBF   |                   | Telefon des Anmelders/Vertreters<br>089/65 00 86   | Datum<br>23. Febr. 1997 |
| ③ | Der Empfänger in Feld ① ist der<br><input type="checkbox"/> Anmelder <input type="checkbox"/> Zustellungsbevollmächtigte   |                   | <input checked="" type="checkbox"/> Vertreter<br>ggf. Nr. der Allgemeinen Vollmacht  |                         |
| ④ | <b>Anmelder</b><br>Gesellschaft für Bio-<br>technologische Forschung<br>mbH (GBF)<br>Mascheroder Weg 1<br>D-38124 Braunschweig   |                   | <b>Vertreter</b><br>Dr. Hans D. Boeters<br>Dipl.-Ing. Robert Bauer<br>Dr. Enno Meyer<br>Bereiteranger 15<br>81541 München  |                         |
| ⑤ | Anmeldercode-Nr.   | Vertretercode-Nr. | Zustelladressecode-Nr.   |                         |
| ⑥ | <b>Bezeichnung der Erfindung (bei Überlänge auf gesondertem Blatt - 2fach)</b><br>Seitenkettenmodifizierte Epothilone  |                   |  |                         |
| ⑦ | <b>Sonstige Anträge</b><br><input type="checkbox"/> Die Anmeldung ist Zusatz zur Patentanmeldung (zum Patent) →<br><input type="checkbox"/> Prüfungsantrag - Prüfung der Anmeldung (§ 44 Patentgesetz)<br><input type="checkbox"/> Recherchenantrag - Ermittlung der öffentlichen Druckschriften ohne Prüfung (§ 43 Patentgesetz)<br><input type="checkbox"/> Lieferung von Ablichtungen der ermittelten Druckschriften im <input type="checkbox"/> Prüfungsverfahren <input type="checkbox"/> Recherchungsverfahren<br><input type="checkbox"/> Aussetzung des Erteilungsbeschlusses auf _____ Monate<br>(§ 49 Abs. 2 Patentgesetz) (Max. 15 Mon. ab Anmelde- oder Prioritätstag) |                   | Aktenzeichen der Hauptanmeldung (des Hauptpatents)   |                         |
| ⑧ | <b>Erklärungen</b><br><input type="checkbox"/> Teilung/Ausscheidung aus der Patentanmeldung →<br><input type="checkbox"/> an Lizenzvergabe interessiert (unverbindlich)<br><input type="checkbox"/> mit vorzeitiger Offenlegung und damit freier Akteneinsicht einverstanden (§ 31 Abs. 2 Nr. 1 Patentgesetz)  |                   | Aktenzeichen der Stammanmeldung  |                         |
| ⑨ | <input type="checkbox"/> Inländische Priorität (Datum, Aktenzeichen der Voranmeldung)<br><input type="checkbox"/> Ausländische Priorität (Datum, Land, Aktenz. der Voranmeldung) } bei Überlänge auf gesondertem Blatt - 2fach)  |                   |  |                         |
| ⑩ | <b>Gebühreuzahlung in Höhe von _____ DM</b><br><input type="checkbox"/> Scheck ist beigelegt <input type="checkbox"/> Überweisung (nach Erhalt der Empfangsbescheinigung)  |                   | Abbuchung von meinem/v unserem Ab-<br>buchungskonto b. d. Dresdner Bank AG,<br>München<br><input type="checkbox"/> Gebührenmarken sind beigelegt (bitte nicht auf d. Rückseite kleben, ggf. auf gesond. Blatt) <input type="checkbox"/> Nr.: |                         |

Diese Patentanmeldung ist an dem durch Perforierung angegebenen Tag beim Deutschen Patentamt eingegangen. Sie hat das mit "P" gekennzeichnete Aktenzeichen erhalten.

Dieses Aktenzeichen ist gemäß den Anmeldebestimmungen bei allen Eingaben anzugeben. Bei Zahlungen ist der Verwendungszweck hinzuzufügen.

Nur von der Annahmestelle auszufüllen:

☐ Für die obengenannte Anmeldung sind Gebührenmarken im Wert von \_\_\_\_\_ DM entrichtet.



Bitte beachten Sie die Hinweise auf der Rückseite der zurückbehaltenen Antragsdurchschrift

EB

**BOETERS & BAUER**

PATENTANWÄLTE  
EUROPEAN PATENT ATTORNEYS  
EUROPEAN TRADEMARK ATTORNEYS

**BEREITERANGER 15  
D-81541 MÜNCHEN**

**PA. BOETERS & BAUER  
BEREITERANGER 15, D-81541 MÜNCHEN**

**DIPL.-CHEM. DR. HANS D. BOETERS  
DIPL.-ING. ROBERT BAUER  
PHYS. DR. ENNO MEYER**

**TELEFON: (089) 65 00 86  
TELEFAX: (089) 65 39 62**

**24. Februar 1997**

**Unser Zeichen: 8513-GBF  
Neue deutsche Patentanmeldung  
Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (GBF)**

**Seitenkettenmodifizierte Epothilone**

### Versuch 1: Diepoxypothilon A. (1a)

Eine Lösung von Epothilon A (5 mg, 10 µmol) in Aceton (1 ml) wurde bei 0 °C mit Dimethyldioxiran (0.4 ml, 28 µmol, 0.07 M in Aceton) versetzt. Die Lösung wurde über einige Stunden auf Raumtemperatur gebracht und 20 h bei dieser Temperatur gerührt. Da nach DC noch Edukt vorhanden war, wurde weiteres Dimethyldioxiran (0.25 ml, 17 µmol) zugegeben und das Reaktionsgemisch erneut 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand mittels PSC (0.25 x 200 x 200 mm, 10% MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) gereinigt. Es wurden isoliert:

1. 1.4 mg (27%) Diepoxypothilon A (3:2 Epimerengemisch an C16-C17).  $R_f$ : 0.63 (10% MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>);  $R_t$ : 6.79 (Isomer 1) und 7.39 (Isomer 2) min (RP 18, 250 x 4 mm, MeOH:H<sub>2</sub>O 65:35, 1 ml/min); MS: (m/z) = 510 (M<sup>+</sup>); <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ausgewählte Signale, Isomer 1): δ = 6.96 (s, 1H, H-19), 5.48 (dd,  $J$  = 12.2 und 2.5 Hz, 1H, H-15), 4.37 (dbr,  $J$  = 10.7 Hz, 1H, H-3), 4.10 (s, 1H, H-17), 3.67 (dd,  $J$  = 5.6 und 2.5 Hz, 1H, H-7), 3.14 (qd,  $J$  = 6.6 und 2.5 Hz, 1H, H-6), 3.00 (ddd,  $J$  = 9.7, 3.6 und 2.5 Hz, 1H, H-13), 2.88 (dt,  $J$  = 8.6 und 3.6 Hz, 1H, H-12), 2.71 (s, 3H, H-21), 2.53 (dd,  $J$  = 13.7 und 11.7 Hz, 1H, H-2a), 1.41 (s, 3H, H-22), 1.27 (s, 3H, H-26), 1.17 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 3H, H-24), 1.08 (s, 3H, H-23), 0.97 (d,  $J$  = 7.1 Hz, 3H, H-25); (Isomer 2) δ = 6.98 (s, 1H, H-19), 5.11 (dd,  $J$  = 11.7 und 2.5 Hz, 1H, H-15), 4.27 (dbr,  $J$  = 10.7 Hz, 1H, H-3), 4.14 (s, 1H, H-17), 3.06 (qd,  $J$  = 6.6 und 2.9 Hz, 1H, H-6), 2.96 (ddd,  $J$  = 9.7, 3.6 und 2.5 Hz, 1H, H-13), 2.31 (dt,  $J$  = 14.7 und 2.0 Hz, 1H, H-14a), 1.36 (s, 3H, H-22), 1.15 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 3H, H-24), 1.14 (s, 3H, H-26), 1.07 (s, 3H, H-23).
2. 0.8 mg (16%) Epothilon A N-Oxid.  $R_f$ : 0.44 (10% MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>);  $R_t$ : 4.25 min (RP 18, 250 x 4 mm, MeOH:H<sub>2</sub>O 65:35, 1 ml/min); MS: (m/z) = 510 (M<sup>+</sup>); <sup>1</sup>H-NMR: siehe Methode 1

### Versuch 2: Dihydroepothilon A. (1c)

Zu einer Lösung von Epothilon A (11 mg, 22 µmol) in Ethanol (2 ml) wurde Palladium auf Aktivkohle (5 mg, 10%) gegeben und die schwarze Suspension 24 h bei Raumtemperatur einer H<sub>2</sub>-Atmosphäre ausgesetzt. Da die Umsetzung nach DC noch nicht vollständig war, wurde eine weitere Portion Pd/C zugesetzt und das Reaktionsgemisch weitere 20 h unter einer H<sub>2</sub>-Atmosphäre gerührt. Die Trennung der Produkte erfolgte mittels PSC (1 x 200 x 200 mm, 10% MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Es wurden isoliert:

1. 0.5 mg (5%) Dihydroepothilon A.  $R_f$ : 0.60 (10% MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>);  $R_t$ : 10.80 min (RP 18, 250 x 4 mm, MeOH:H<sub>2</sub>O 65:35, 1 ml/min); MS: (m/z) = 496 (M<sup>+</sup>), 478, 408, 308; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ausgewählte Signale): δ = 7.05 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 1H, OH), 6.77 (s, 1H, H-19), 5.23 (dd,  $J$  = 12.4 und 2.3 Hz, 1H, H-15), 4.42 (ddd,  $J$  = 11.7, 6.6 und 3.0 Hz, 1H, H-3), 3.70 (ddd,  $J$  = 5, 3 und 2 Hz, 1H, H-7), 3.12 (qd,  $J$  = 6.6 und 3.0 Hz, 1H, H-6), 3.07 (d,  $J$  = 12.7 Hz, 1H, H-17a), 2.96 (ddd,  $J$  = 9.7, 3.6 und 2.0 Hz, 1H, H-13), 2.91 (ddd,  $J$  = 9.7, 3.6 und 2.6 Hz, 1H, H-12), 2.68 (s, 3H, H-21), 2.51 (dd,  $J$  = 13.7 und 11.7 Hz, 1H, H-2a), 2.24 (d,  $J$  = 12.7 Hz, 1H, H-17b), 2.19 (m, 1H, H-16), 2.13 (dd,  $J$  = 13.7 und 3.0 Hz, 1H, H-2b), 1.35 (s, 3H, H-22), 1.15 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 3H, H-24), 1.09 (s, 3H, H-23), 0.99 (d,  $J$  = 7.1 Hz, 3H, H-25), 0.93 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 3H, H-26).
2. 8 mg (72%) 15-Deoxy-dihydroepothilonsäure.  $R_f$ : 0.10 (10% MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

### Versuch 3: 16-Hydroxyepothilon A. (1b)

Zu einer Lösung von Diepoxypothilon A (7 mg, 14 µmol), 1:1 Epimerengemisch an C-16 in Ethanol (2 ml) wurde Palladium auf Aktivkohle (10 mg, 10%) gegeben und die schwarze Suspension 24 h bei Raumtemperatur einer H<sub>2</sub>-Atmosphäre ausgesetzt. Da die Umsetzung nach

DC noch nicht vollständig war, wurde eine weitere Portion Pd/C zugesetzt und das Reaktionsgemisch weitere 80 h unter einer  $H_2$ -Atmosphäre gerührt. Die Trennung der Produkte erfolgte mittels PSC (1 x 200 x 200 mm, 10% MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Es wurden isoliert:

1. 3 mg (43%) 16-Hydroxyepothilon A (Isomer 1).  $R_f$ : 0.38 (10% MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>);  $R$ : 6.65 min (RP 18, 250 x 4 mm, MeOH:H<sub>2</sub>O 65:35, 1 ml/min); <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ausgewählte Signale):  $\delta$  = 6.85 (s, 1H, H-19), 5.02 (dd,  $J$  = 11.7 und 2.0 Hz, 1H, H-15), 4.38 (dbr,  $J$  = 11.2 Hz, 1H, H-3), 3.67 (dd,  $J$  = 4 und 3 Hz, 1H, H-7), 3.14 (qd,  $J$  = 6.8 und 3.0 Hz, 1H, H-6), 2.95 (d,  $J$  = 15.3 Hz, 1H, H-17a), 2.89 (d,  $J$  = 15.3 Hz, 1H, H-17b), 2.89 (ddd,  $J$  = 10.2, 3.6 und 2.0 Hz, 1H, H-13), 2.81 (ddd,  $J$  = 9.7, 3.6 und 2.5 Hz, 1H, H-12), 2.70 (s, 3H, H-21), 2.53 (dd,  $J$  = 15.8 und 11.7 Hz, 1H, H-2a), 2.14 (dd,  $J$  = 15.8 und 2.0 Hz, 1H, H-2b), 2.08 (dt,  $J$  = 14.3 und 2.0 Hz, 1H, H-14a), 1.39 (s, 3H, H-22), 1.25 (s, 3H, H-26), 1.19 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 3H, H-24), 1.05 (s, 3H, H-23), 0.99 (d,  $J$  = 7.1 Hz, 3H, H-25).

2. 3 mg (43%) 16-Hydroxyepothilon A (Isomer 2).  $R_f$ : 0.31 (10% MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>);  $R$ : 6.10 min (RP 18, 250 x 4 mm, MeOH:H<sub>2</sub>O 65:35, 1 ml/min); <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ausgewählte Signale):  $\delta$  = 6.85 (s, 1H, H-19), 5.21 (dd,  $J$  = 11.3 und 1.9 Hz, 1H, H-15), 4.42 (dbr,  $J$  = 10.5 Hz, 1H, H-3), 3.71 (sbr, 1H, H-7), 3.21 (d,  $J$  = 14.3 Hz, 1H, H-17a), 3.13 (qd,  $J$  = 6.8 und 3.0 Hz, 1H, H-6), 3.09 (dt,  $J$  = 9.8 und 3.4 Hz, 1H, H-13), 2.87 (dt,  $J$  = 9.4 und 3.0 Hz, 1H, H-12), 2.73 (d,  $J$  = 14.3 Hz, 1H, H-17b), 2.68 (s, 3H, H-21), 2.63 (dd,  $J$  = 16.6 und 11.7 Hz, 1H, H-2a), 2.27 (dt,  $J$  = 14.7 und 2.3 Hz, 1H, H-14a), 2.24 (dd,  $J$  = 16.6 und 2.6 Hz, 1H, H-2b), 1.39 (s, 3H, H-22), 1.22 (s, 3H, H-26), 1.19 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 3H, H-24), 1.05 (s, 3H, H-23), 0.99 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 3H, H-25).

**Ep thil n A-N-oxid ( 2a ):** Zu 100 mg Epothilon A in 1 ml Dichlormethan werden 100 mg 70 %ige *m*-Chlorperbenzoesäure in 0.5 ml Dichlormethan gegeben. Nach 6-stündigem Rühren bei Raumtemperatur wird mit Dichlormethan verdünnt und nacheinander mit Natriumsulfitlösung zur Zerstörung von überschüssiger Persäure und Natriumbicarbonatlösung ausgeschüttelt. Das Lösungsmittel wird i. Vak abgedampft, der Rückstand durch präparative HPLC an einer Nucleosil RP-18 Säule ( 250 x 20 mm, Laufmittel Methanol / Wasser 60 : 40 ) aufgetrennt. Ausbeute 60 mg farbloses Öl.

$R_f$  = 0.60 ( Kieselgel DC Alufolie, Laufmittel Dichlormethan / Methanol 9:1);

ESI-MS (neg. Ionen)  $m/z$  510;

UV ( Methanol ) :  $\lambda_{max}$  240 nm;

$^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): C-1 170.5, C-2 39.9, C-3 70.8, C-4 55.1, C-5 221.4, C-6 40.9, C-7 72.9, C-8 37.6, C-9 31.8, C-10 22.8, C-11 28.0, C-12 58.0, C-13 55.8, C-14 32.2, C-15 75.5, C-16 144.5, C-17 111.4, C-18 143.4, C-19 110.3, C-20 145.6, C-21 13.5, C-22 15.4, C-23 23.3, C-24 12.0, C-25 16.5, C-27 18.2 ppm;

$^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 2a-H 2.12 dd, 2b-H 2.47 dd, 3-H 4.55 dd, 3-OH 6.48 breit, 6-H 3.25 dq, 7-H 3.72 dd, 8-H 1.81 m, 9a-H 1.34 m, 9b-H 1.56 m, 10-H<sub>2</sub> 1.48 m, 11a-H 1.27 m, 11b-H 1.87 m, 12-H 2.92 ddd, 13-H 2.98 m, 14a-H 1.67 ddd, 14b-H 2.23 d, 15-H 5.33 d, 17-H 6.82 s, 19-H 7.09 s, 21-H<sub>2</sub> 2.61 s, 22-H<sub>2</sub> 1.02 s, 23-H<sub>2</sub> 1.42 s, 24-H<sub>2</sub> 1.18 d, 25-H<sub>2</sub> 0.99 d, 27-H<sub>2</sub> 2.04 s ppm.

**21-Acetoxyepothilon A ( = 21-Acetylepothilon E ) ( 3a ):** Zu 50 mg Epothilon A-N-oxid (2a) in 0.5 ml Dichlormethan werden 0.05 ml 2,6-Di-*tert*.-butylpyridin und 0.1 ml Acetanhydrid gegeben. Nach 15 Minuten Erwärmen auf 75°C werden im Vakuum Lösungsmittel und Reagenzien abgedampft, der Rückstand durch präparative HPLC an Nucleosil RP-18 ( 250 x 20 mm, Laufmittel Methanol / Wasser 60 : 40 ) aufgetrennt. Ausbeute 30 mg farbloses Öl.

$R_f$  = 0.50 ( Kieselgel DC Alufolie, Laufmittel Dichlormethan / Methanol 95 : 5);

ESI-MS (neg. Ionen):  $m/z$  552;

UV ( Methanol )  $\lambda_{max}$  210, 250 nm;

$^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , gegenüber 2a veränderte Signale): 15-H 5.45 dd, 17-H 6.60 s, 19-H 7.15 s, 21-H<sub>2</sub> 5.35 s,  $\text{CH}_3\text{CO}$  2.15 s ppm.

**Epothilon E ( 3b ):** Zu 10 mg 21-Acetoxyepothilon A (3a) in 0.5 ml Methanol gibt man 1 Tropfen konz. Ammoniaklösung, erwärmt 1 Stunde auf 40°C und dampft i. Vak. zur Trockene ein. Der Rückstand wird durch präparative DC aufgetrennt. Ausbeute 6mg, identisch mit einer authentischen Probe Epothilon E.

Versuch 4: 19-Methylepothilon A. (4b)

Eine Lösung von Epothilon A (15 mg, 30  $\mu$ mol) in THF (1 ml) wurde bei -90 °C mit *n*-Butyllithium (100  $\mu$ l, 160  $\mu$ mol, 1.6 M in Hexan) versetzt. Die Lösung färbte sich sofort goldorange. Nach 15 min Rühren bei -90 °C wurde die Reaktionslösung mit Methyljodid (100  $\mu$ l, 1.6 mmol) versetzt. Die resultierende schwach grünlichgelbe Lösung wurde auf -30 °C erwärmt und mit pH = 7.0 Puffer (2 ml) gequenchst. Mit 0.1 N Salzsäure wurde die Emulsion auf pH 6 gebracht. Nach Sättigung mit festem NaCl wurde die wässrige Phase mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 5 ml) und Ethylacetat (5 ml) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotavap entfernt. Die Reinigung erfolgte über PSC (1 x 200 x 200 mm, 10% MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) und HPLC (RP 18, 250 x 16 mm, MeOH:H<sub>2</sub>O 65:35). Es wurden isoliert:

1. 2.5 mg (17%) 19-Methylepothilon A.  $R_f$  0.50 (10% MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>);  $R_t$  11.70 min (RP 18, 250 x 4 mm, MeOH:H<sub>2</sub>O 65:35, 1 ml/min); MS: (m/z) = 508 ( $M^+$ ), 420, 320; <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ausgewählte Signale):  $\delta$  = 6.41 (s, 1H, H-17), 5.46 (dd,  $J$  = 9.0 und 2.3 Hz, 1H, H-15), 4.15 (dd,  $J$  = 10.5 und 3.0 Hz, 1H, H-3), 3.77 (dd,  $J$  = 8 und 4 Hz, 1H, H-7), 3.20 (qd,  $J$  = 6.8 und 4.5 Hz, 1H, H-6), 3.04 (dt,  $J$  = 7.5 und 3.8 Hz, 1H, H-13), 2.91 (dt,  $J$  = 7.5 und 3.8 Hz, 1H, H-12), 2.61 (s, 3H, H-21), 2.51 (dd,  $J$  = 14.4 und 10.5 Hz, 1H, H-2a), 2.38 (dd,  $J$  = 14.4 und 3.0 Hz, 1H, H-2b), 2.32 (s, 3H, H-27), 2.15 (ddd,  $J$  = 15.1, 3.8 und 3.0 Hz, 1H, H-14a), 2.01 (d,  $J$  = 1.5 Hz, 3H, H-26), 1.91 (dt,  $J$  = 15.1 und 8.8 Hz, 1H, H-14b), 1.34 (s, 3H, H-22), 1.16 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 3H, H-24), 1.10 (s, 3H, H-23), 1.00 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 3H, H-25).
2. ca. 50% Epothilon A

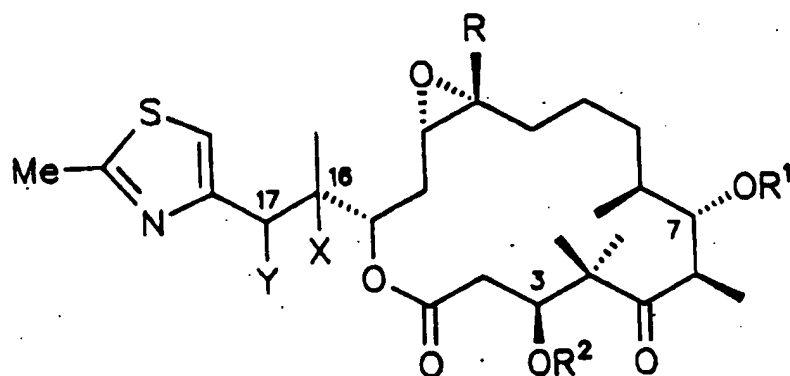
Versuch 5: 19-Bromepothilon A. (4a)

Eine Lösung von Epothilon A (25 mg, 50  $\mu$ mol) in THF (2.5 ml) wurde bei -90 °C mit *n*-Butyllithium (160  $\mu$ l, 225  $\mu$ mol, 1.6 M in Hexan) versetzt. Die Lösung färbte sich sofort

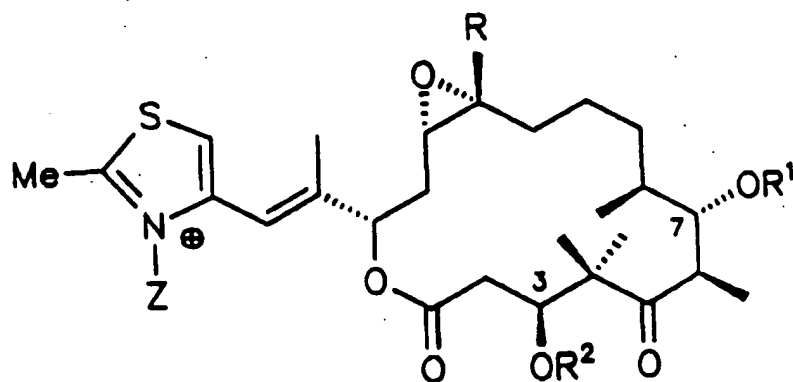
goldorange. Nach 15 min Rühren bei -90 °C wurde N-Bromsuccinimid (27 mg, 150 µmol), gelöst in THF (0.5 ml), hinzugegeben. Die Lösung entfärbte sich langsam. Die nun schwach bräunliche Reaktionsmischung wurde auf -30 °C erwärmt und mit 0.1 N Salzsäure (1 ml) auf pH 6.5 gebracht. Nach Sättigung mit festem NaCl wurde die wässrige Phase mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 5 ml) und Ethylacetat (5 ml) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotavap entfernt. Die Reinigung erfolgte über PSC (1 x 200 x 200 mm, 10% MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) und HPLC (RP 18, 250 x 16 mm, MeOH:H<sub>2</sub>O 65:35). Es wurden isoliert:

1. 2.6 mg (9%) 19-Bromepothilon A.  $R_f$  0.53 (10% MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>);  $R_t$  20.78 min (RP 18, 250 x 4 mm, MeOH:H<sub>2</sub>O 65:35, 1 ml/min); MS: (m/z) = 574 und 572 (M<sup>+</sup>), 556, 554, 468, 466, 386, 384, 341; <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ausgewählte Signale): δ = 6.43 (s, 1H, H-17), 5.46 (dd,  $J$  = 8.7 und 2.3 Hz, 1H, H-15), 4.13 (ddd,  $J$  = 9.4, 6.0 und 3.8 Hz, 1H, H-3), 3.80 (dd,  $J$  = 8 und 4 Hz, 1H, H-7), 3.38 (d,  $J$  = 6.0 Hz, 1H, OH), 3.22 (qd,  $J$  = 6.8 und 5.3 Hz, 1H, H-6), 3.05 (dt,  $J$  = 8.3 und 4.1 Hz, 1H, H-13), 2.91 (dt,  $J$  = 7.5 und 3.7 Hz, 1H, H-12), 2.66 (s, 3H, H-21), 2.55 (dd,  $J$  = 14.7 und 9.4 Hz, 1H, H-2a), 2.47 (dd,  $J$  = 14.7 und 3.8 Hz, 1H, H-2b), 2.16 (d,  $J$  = 1.1 Hz, 3H, H-26), 2.14 (dt,  $J$  = 14.7 und 3.8 Hz, 1H, H-14a), 1.90 (dt,  $J$  = 15 und 8.3 Hz, 1H, H-14b), 1.34 (s, 3H, H-22), 1.17 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 3H, H-24), 1.11 (s, 3H, H-23), 1.01 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 3H, H-25).
2. ca. 60% Epothilon A.

# Synthesebeispiele 1a bis 5a

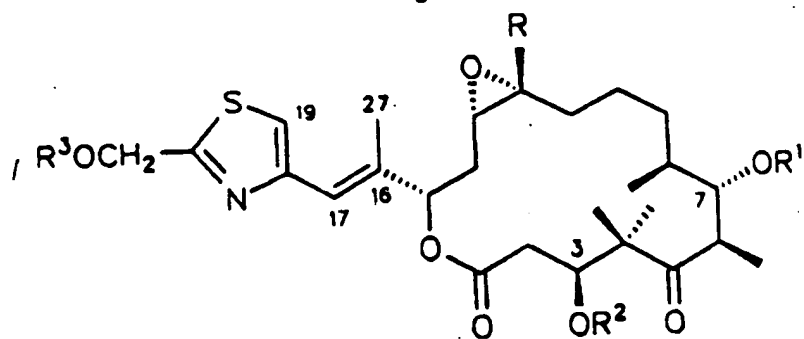


- 1a ~~R = CH<sub>3</sub>~~, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> = H, X, Y = -O-, R = H  
 b ~~R = CH<sub>3</sub>~~, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> = H, X = OH, Y = H, R = H  
 c ~~R = CH<sub>3</sub>~~, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> = H, X = H, Y = H, R = H

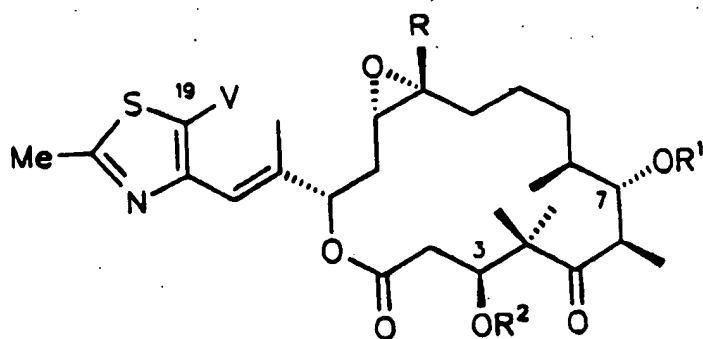


- 2a ~~R = CH<sub>3</sub>~~, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> = H, Z = O<sup>-</sup>, R = H  
 b ~~R = CH<sub>3</sub>~~, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> = H, Z = OCH<sub>3</sub>, BF<sub>4</sub><sup>-</sup>, R = H

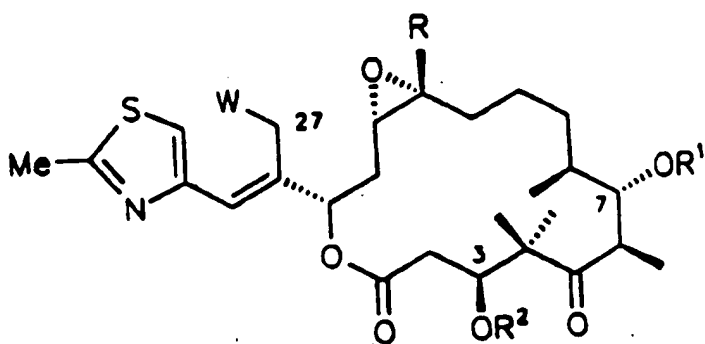




- 3a  ~~$R = CH_3$~~ ,  $R^1, R^2 = H$ ,  $R^3 = \text{Acetyl}$ ,  $R = H$   
 b  ~~$R = CH_3$~~ ,  $R^1, R^2, R^3 = H$ ,  $R = H$



- 4a  ~~$R = CH_3$~~ ,  $R^1, R^2 = H$ ,  $V = Br$ ,  $R = H$   
 b  ~~$R = CH_3$~~ ,  $V = CH_3$ ,  $R^1, R^2 = H$ ,  $R = H$



- 5a  ~~$R = CH_3$~~ ,  $R^1, R^2 = H$ ,  $W = OH$ ,  $R = H$

25. Februar 1997/St

Unser Zeichen: 8513-GBF  
Neue deutsche Patentanmeldung  
Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (GBF)

#### Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von in 16,17-Stellung modifizierten Epothilonen, bei dem man von 3,7-geschützten oder ungeschützten Epothilonen A oder B ausgeht und
  - a) diese an der 16,17-Doppelbindung hydriert oder
  - b) an der 16,17-Doppelbindung Halogen addiert oder
  - c) an der 16,17-Doppelbindung epoxidiert und gegebenenfalls das erhaltene Epoxid zum 16-Alkohol reduziert.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man bei
  - Methode (a) mit Diimin oder Wasserstoff und einem heterogenen oder homogenen Metallkatalysator hydriert oder bei
  - Methode (c) mit einer Persäure oder einem Dioxiran epoxidiert.
3. Verfahren zur Herstellung von Epothilon-N-oxiden, bei dem man 3,7-geschützte oder ungeschützte Epothilone A oder B in an sich bekannter Weise in ein N-Oxid überführt und das erhaltene N-Oxid gegebenenfalls einer O-Alkylierung unterwirft und ein O-Alkylierungsprodukt gewinnt.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß man die N-Oxidierung mit Persäure oder einem Dioxiran durchführt und

für die fakultative O-Alkylierung elektrophile Alkyl-, Aryl- oder Heteroaryl-Reagenzien verwendet, insbesondere Methyliodid oder Trimethyloxoniumtetrafluorborat.

5. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch *gekennzeichnet*, daß man ein erhaltenes N-Oxid einer Katada-Reaktion unterwirft, insbesondere gemäß Houben-Weyl, Band E7b, Seite 646.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch *gekennzeichnet*, daß man die Katada-Reaktion mit einem aktivierten Carbonsäurederivat durchführt, insbesondere Carbonsäureanhydrid oder Carbonsäurechlorid.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch *gekennzeichnet*, daß man die Katada-Reaktion mit Acetanhydrid durchführt und die gewonnenen 21-Acetoxyepothilone gegebenenfalls in an sich bekannter Weise zu 21-Hydroxy-epothilonen A oder B spaltet (Epothilone E bzw. F).

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch *gekennzeichnet*, daß man die fakultative Spaltung hydrolytisch oder enzymatisch durchführt.

9. Verfahren zur Herstellung von in C19-Stellung modifizierten Epothilonen, bei dem man 3,7-geschützte oder ungeschützte Epothilone A oder B in C19-Stellung metalliert und in an sich bekannter Weise mit elektrophilen Reagenzien als in C19-Stellung modifizierte alkyl-, aryl-, heteroaryl-, halogen-, sauerstoff- oder schwefelsubstituierte Epothilone abfängt.

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch *gekennzeichnet*, daß man mit Butyllithium metalliert.

11. Verfahren zur Herstellung in C27-Stellung modifizierten Epothilonen, bei dem man die Allylgruppierung (C17, C16 und C27) in an sich bekannte Weise an der C27-Methylgruppe durch ein heteroatom substituiert.

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch *gekennzeichnet*, daß man die C<sub>27</sub>-Methylgruppe mit einem Bromatom substituiert, insbesondere mit Hilfe von N-Bromsuccinimid, und das erhaltene Bromid gegebenenfalls in eine C<sub>27</sub>-Hydroxy-Verbindung überführt.

WO 98/3 8192

and

DE 19707505.3

1/1 WPIL - (C) Derwent

PN - WO9838192 A1 19980903 DW1998-41 C07D-493/04 Ger 20p \*

AP: 1998WO-EP01060 19980225

DSNW: AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY CA CH CN CU CZ DE DK EE ES FI GB  
GE GH GM GW HU ID IL IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MD MG  
MK MN MW MX NO NZ PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TR TT UA UG US  
UZ VN YU ZW

DSRW: AT BE CH DE DK EA ES FI FR GB GH GM GR IE IT KE LS LU MC MW NL  
OA PT SD SE SZ UG ZW

- ZA9801575 A 19981125 DW1999-01 C07D-000/00 14p

AP: 1998ZA-0001575 19980225

- AU9867249 A 19980918 DW1999-08 C07D-493/04

FD: Based on WO9838192

AP: 1998AU-0067249 19980225

AN - 1998-481129 [41]

DC - B02

AB - WO9838192 A

Production of a C16,C17-modified epothilone (IA) comprises subjecting a C3,C7-optionally protected epothilone A or B (IIA) to: (a) hydrogenation of the 16,17-double bond; or (b) halogen addition at the 16,17-double bond; or (c) epoxidation at the 16,17-double bond and optional reduction of the resulting epoxide to the C16-alcohol. Also claimed are: (A) the production of a 2,3-unsaturated epothilone N-oxide (IB) by: (i) N-oxidising a 3,7-protected epothilone A or B (IIB) in a known manner and eliminating the C3-substituent by base treatment; or (ii) N-oxidising a C7-optionally protected-2,3-unsaturated-epothilone A or B (IIC) in a known manner and optionally O-alkylating the resulting N-oxide in a known manner; (B) the production of an epothilone N-oxide (IC) by N-oxidising (IIA) in a known manner and optionally O-alkylating the resulting N-oxide in a known manner; (C) the production of a C19-(alkyl, aryl, heteroaryl, halo, oxygen or sulphur)-substituted epothilone (ID) by metallating (IIA) at C19 and then reacting with an electrophile to introduce the C19 substituent; and (D) the production of a C27-hetero substituted epothilone (IE) by substituting the C27 methyl group by a heteroatom in a known manner.

- USE - Epothilone A and B are known from e.g. DE4138042 and PCT/EP9605080. (Dwg.0/0)

PR - 1997DE-1007505 19970225